

# PCR을 이용한 치주환자의 타액과 치은연하치태의 세균분포에 관한 연구

최옥선<sup>1</sup>, 안광숙<sup>1</sup>, 김혜진, 이은숙

대전대학교 생물학과<sup>1</sup>, 김천대학 치위생과

색인: PCR, 치주질환, *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*

## 1. 서 론

치주질환은 치아 지지조직의 염증을 유발할 뿐만 아니라<sup>1)</sup> 종창, 치주낭 형성 및 치조골의 상실 등 일련의 증상진행과 이로 인한 치아의 상실을 초래한다. 이러한 치주질환의 가장 중요한 원인이 세균이라는 사실이 이미 널리 인정되고 있으며 치주질환의 형태에 따라 이와 관련된 세균의 집단도 각기 다르다는 것이 밝혀지고 있다<sup>2,4)</sup>. 또한 치주질환과 밀접한 관련이 있는 치은연하치태내의 병원균인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Hemophilus aphrophilus* 및 *Hemophilus paraphrophilus* 등은 빈번히 확인되어지는 세균이기도 하다.

치주질환의 원인으로는 치태내 세균과 그 부산물이 가장 중요한 역할을 담당하는 것으로 확인되었으며<sup>5)</sup> 그 중에서도 특히 치은연하치태내의 세균이 주로 관여하는 것으로 보고되었다

<sup>6,7)</sup>. 또한 다량의 치태가 축적된 사람은 치주질환에 이환 될 위험도가 높다고 간주되어 왔다<sup>8)</sup>.

구강내에는 500 여 종의 다양한 세균이 존재하며 치주질환을 야기시키는 치은연하치태에서 존재한다<sup>9)</sup>. 치주질환 환자의 치은연하치태에 존재하는 다양한 종류의 세균 가운데 소수의 세균 종만이 건강한 상태에서 치주질환 상태로 전이하는 데 관련이 있으며, 이들 세균 중 그람 음성 혐기성 세균의 비율이 증가할 경우 증식된 혐기성 그람음성 세균의 독소 및 대사산물이 치주조직을 파괴시키거나 면역계를 자극하여 치주조직의 질환을 유발하는 등<sup>10)</sup> 질환 발생의 심각도가 증가<sup>11)</sup>한다고 볼 수 있다. 치주질환 환자의 30~90%는 성인 및 청소년 환자에서 *A. actinomycetemcomitans*가 발견되며<sup>12)</sup>, 드물게는 건강한 어린이에서도 발견되고, 다양한 형태의 치주질환 특히 청소년 치주질환 및 노령의 치주질환 환자에서 발견되어 왔다<sup>13)</sup>.

또한 청소년 치주질환 환자를 가진 부모의 85% 이상이 성인치주염을 가진 것으로 나타났고 이 중 31%에서 *A. actinomycetemcomitans*가 발견되었다고 보고되었다<sup>14,15)</sup>. 또한 치태가 형성되는 초기단계의 *Actinomyces viscosus*, *A. israelii*, *Streptococcus mutans* 등의 그람양성 세균이 치주질환과 관련되고<sup>16)</sup> 초기단계 이후에는 *A. actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, *H. paraprophilus* 등 수 많은 그람음성 세균들이 치주질환과 관련된다고 보고되었다<sup>16-18)</sup>.

따라서 본 연구는 선진들의 연구를 바탕으로 하여 치주질환이 진행되고 있거나 만성적으로 앓고 있는 환자의 특정한 세균을 식별하거나 치주질환을 앓지 않는 대상자의 구강내 세균분포에 따른 특징을 분석하기 위함이며 나아가 치주질환과 관련성 있는 미생물을 연구함으로써 임상적 진단을 촉진시키는데 있다.

최근에 이러한 구강내 존재하는 세균 종과 치주질환 사이의 연관성을 신속하고 정확하게 밝히기 위한 PCR(polymerase chain reaction)은 구강 공동내의 세균의 DNA를 검출하기 위한 좋은 방법이며, in vitro에서 specific DNA의 단편을 효소적으로 빠르게 증폭하기 위한 일련의 과정으로서 세균의 유전자 검출에 이용되는 특정한 primer를 사용하는 것이다.

그러므로 연구자는 PCR을 이용하여 구강 공동내의 치은연하치태와 타액내의 치주질환과 관련된 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Hemophilus aphrophilus* 및 *Hemophilus paraprophilus*의 분포를 알아보고자 치주학적으로 건강한 피실험자 30명 및 치주질환을 가진 92명 환자의 치은연하치태와 타액을 채취하여 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraprophilus* 세균에 대한 PCR을 실시하고 제한효소를 이용하여 각 세균에 대한 RFLP(restriction fragment length polymorphism)을 실

시한 결과를 보고하는 바이다.

## 2. 연구대상 및 방법

### 2.1 연구대상

본 연구의 대상은 대전지역에 소재한 E 대학 부속병원 치과에 2001년 1월부터 6월까지 치주질환 치료를 위하여 내원한 환자 중 92명과 치주학적으로 건강한 환자 30명의 치은연하치태와 타액에서 DNA를 추출하여 실험재료로 사용하였다. 환자의 평균 연령은 38.5세이며 남자가 70명, 여자가 52명이었다. 대상자에게 자기 기입식으로 설문지를 작성하게 하여 그 중 최종적으로 작성된 122명을 연구대상으로 하였다.

### 2.2 DNA 추출

#### 2.2.1 Plaque에서 DNA 추출

구강진료 의자에서 치경과 탐침으로 전체 구강을 검사한 후 무균 curett을 사용하였으며 치은연하치태는 구강내 전반적으로 치은염을 동반하고 치주낭이 3mm 이상을 기준으로 상·하악 전치부, 구치부 제 1 대구치 및 2 대구치에서 채취하였다. 채취한 치은연하치태를 1.5ml의 멸균 증류수에 넣고 침전시킨 후 1.5ml microtube에 넣어 9,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 pipette으로 상층액을 버린 후 침전물에 467 µl TE buffer(10% SDS 30 ml + 20 mg/ml Proteinase K 3 ml)를 넣어 37°C water bath에서 1 시간 동안 incubation 시킨다. 그런 다음 동량의 phenol을 넣어 완전히 섞이도록 흔들어 준 후 9,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였고, 원심분리 후 상층액을 새 tube에 넣고 다시 동량의 페놀을 넣어 원심분리시켰다.

전체 부피의 10분의 1에 해당하는 sodium

acetate를 첨가하여 0.6배 부피의 isopropanol을 첨가한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 시켰다. 그리고 4,500 rpm에서 15분 동안 원심분리 후 상층액은 버리고 70% 에탄올을 첨가하여 9,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 DNA에 함유된 에탄올을 제거한 후 이를 상온에서 1시간 동안 건조시켰다. 건조시킨 DNA에 적당량의 TE buffer를 첨가하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 PCR에 사용하였다.

### 2.2.2 Saliva에서 DNA 추출

구강진료 의자에서 2ml의 tube에 약 1분간 타액을 모아 1.5 ml 받은 후 치은연하치태에서 DNA를 추출하는 방법과 동일하게 타액에서도 DNA를 얻었다.

## 2.3 Primer 선택

PCR을 위하여 200 ng의 세균 DNA, dNTP 400  $\mu\text{M}$ , primer 10 pmol, 0.2 U의 Taq polymerase(Beringer Menheim Co., Germany) 그리고 5  $\mu\text{l}$  10X buffer를 혼합한 5  $\mu\text{l}$ 의 반응액을 만들었다. PCR에서 primer를 hot start 방법으로  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 변성시킨 후,  $94^{\circ}\text{C}$ 에 1분,  $55^{\circ}\text{C}$ 에 1분,  $72^{\circ}\text{C}$ 에 1분을 30회 반복하고  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 extension 하였다. 이 연구에서 사용된 primer의 염기배열은 <Table 1>과 같다.

## 2.4 Agarose gel electrophoresis

PCR을 실시한 후 PCR의 여부를 확인하기 위하여 PCR 산물의 크기에 따라 0.7~1.0%의 agarose gel electrophoresis를 실시하여 PCR

산물을 확인하였다.

## 2.5 RFLP(Restriction fragment length polymorphism) 분석

PCR 후에 제한 효소 *Hha* I, *Hinf* I을 이용하여 RFLP를 알아보았다. 전체 용량을 20  $\mu\text{l}$ 로 하여 *Hha* I, *Hinf* I을 1  $\mu\text{l}$ (1U), 10X buffer 2  $\mu\text{l}$ , PCR product 10  $\mu\text{l}$ , distilled water 7  $\mu\text{l}$ 를 1.5 ml tube에 넣어  $37^{\circ}\text{C}$  수조에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 2% agarose gel 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 Simon and Joel<sup>1)</sup>의 방법에 따라, 시료 내 균들을 동정 또는 분석하기 위해 RFLP를 시행하였다. *Hha* I를 가진 각 종으로부터 PCR 생성물의 소화에 의해 생성된 제한 파편물의 예상 크기는 *A. actinomycetemcomitans*가 735 및 279 bp, *H. aphrophilus*는 634, 279 및 100 bp, 그리고 *H. paraphrophilus*는 481, 279 및 253 bp이다. *Hinf* I의 경우는 *A. actinomycetemcomitans*가 937 bp, *H. aphrophilus*가 661 및 275 bp, *H. paraphrophilus*가 791 및 124 bp이다.

## 2.6 통계분석

실험군과 대조군에게서 채취한 타액과 치은연하치태에 존재하는 각 세균의 특성 있는 분포를 살펴보기 위해 대상자의 성별과 연령별에 따라 백분율로 나타내었으며 실험군과 대조군의 세균의 분포를 살펴보았다.

# 3. 연구성적

## 3.1 대상자의 성별 · 연령별 분포

전체 대상자 122명에서 연령별 성비에 따른 분포를 살펴보았을 때 30세 미만에서 남자가 32.9%, 여자가 38.5%이며, 31~40세에서는 남자

Table 1. Primer sequences used in this study

| Primer sequence 5'→3' |                               |
|-----------------------|-------------------------------|
| Forward primer        | 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' |
| Reverse primer        | 5'-CCC GGG AAC GTA TTC ACC-3' |

Table 2. Distribution of age and sex on subjects unit: %

| Age      | Female   | male     | Total    |
|----------|----------|----------|----------|
| under 30 | 23(32.9) | 20(38.5) | 43(35.2) |
| 31~40    | 25(35.7) | 17(32.7) | 42(34.4) |
| over 41  | 22(31.4) | 15(28.8) | 37(30.3) |
| Total    | 70(100)  | 52(100)  | 122(100) |

가 35.7%, 여자가 32.7%였다. 41세 이상에서는 남자가 31.4%, 여자가 28.8%이었다(Table 2).

### 3.2 대상자의 성별에 따른 세균의 검출

치주질환 치료를 위하여 내원한 환자 92명과 치주학적으로 건강한 피실험자 30명을 대조군으로 하여 치은연하치태와 타액을 채취하여 PCR을 실시결과 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus* 세균에 대한 성별에 따른 분포는 다음과 같다(Table 3).

대조군에서 남자의 경우, 타액에서 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*가 각각 21.4%, 0%, 21.4%로 나타났으며, 치은연하치태에서 각각 45.0%, 5.0%, 45.0%, 세균이 검출되었다. 또한 여자의 경우 타액에서 *A. actinomycetemcomitans*, *H.*

*aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*가 각각 54.2%, 4.2%, 25.0%로 나타났으며 치은연하치태에서 각각 43.3%, 0%, 50.0%로 나타났다.

실험군에서 남자의 경우, 타액에서 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*가 각각 37.5%, 1.5%, 44.4%로 나타났으며, 치은연하치태에서 각각 52.9%, 0%, 13.5%로 나타났다. 또한 여자의 경우, 타액에서 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*가 각각 49.0%, 0%, 41.2%로 나타났으며 치은연하치태에서 각각 54.4%, 0%, 42.1%로 나타났다.

### 3.3 대상자에 따른 세균의 검출

대조군의 타액에서 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*가 각각 42.1%, 2.6%, 23.7%로 나타났으며, 치은연하치태에서 각각 44.0%, 2.0%, 48.0%로 나타났다. 실험군의 타액에서 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*가 각각 42.3%, 0.8%, 43.1%로 나타났으며, 치은연하치태에서 각각 53.5%, 0%, 43.0%로 나타났다(Table 4).

Table 3. Distribution of bacteria collecting from saliva and plaque in normal eriodontitis patients according to sex N(%)

| Variables     |        | Men          |            |              |              | Total       | Women        |            |              |             | Total       | Total        |
|---------------|--------|--------------|------------|--------------|--------------|-------------|--------------|------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
|               |        | A.α          | H.α        | H.p          | N.D          |             | A.α          | H.α        | H.p          | N.D         |             |              |
| Normal        | Saliva | 3<br>(21.4)  | -          | 3<br>(21.4)  | 8<br>(57.2)  | 14<br>(100) | 13<br>(54.2) | 1<br>(4.2) | 6<br>(25.0)  | 4<br>(16.6) | 24<br>(100) | 38<br>(100)  |
|               | Plaque | 9<br>(45.0)  | 1<br>(5.0) | 9<br>(45.0)  | 1<br>(5.0)   | 20<br>(100) | 13<br>(43.3) | -          | 15<br>(50.0) | 2<br>(6.7)  | 30<br>(100) | 50<br>(100)  |
| Periodontitis | Saliva | 27<br>(37.5) | 1<br>(1.5) | 32<br>(44.4) | 12<br>(16.6) | 72<br>(100) | 25<br>(49.0) | -          | 21<br>(41.2) | 5<br>(9.8)  | 51<br>(100) | 123<br>(100) |
|               | Plaque | 45<br>(52.9) | -          | 37<br>(43.5) | 3<br>(3.6)   | 85<br>(100) | 31<br>(54.4) | -          | 24<br>(42.1) | 2<br>(3.5)  | 57<br>(100) | 142<br>(100) |

A.α, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; H.α, *Hemophilus. aphrophilus*; H.p, *Hemophilus paraphrophilus* and N. D, Not Detected.

Table 4. Comparison of the distribution of *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* and *H. paraphrophilus* in normal and periodontitis patients in this study

unit: %

| Variables     |        | A.α      | H.α    | H.p      | N.D      | Total    |
|---------------|--------|----------|--------|----------|----------|----------|
| Normal        | Saliva | 16(42.1) | 1(2.6) | 9(23.7)  | 12(31.6) | 38(100)  |
|               | Plaque | 22(44.0) | 1(2.0) | 24(48.0) | 3(6.0)   | 50(100)  |
| Periodontitis | Saliva | 52(42.3) | 1(0.8) | 53(43.1) | 17(13.8) | 123(100) |
|               | Plaque | 76(53.5) | -      | 61(43.0) | 5(3.5)   | 142(100) |

A.α, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; H.α, *Hemophilus aphrophilus*; H.p, *Hemophilus paraphrophilus* and N. D, Not Detected.

### 3.4 대상자의 구강 관리 형태

전체 대상자의 칫솔질 횟수를 실험군과 대조군으로 구분하여 살펴본 결과 실험군에서 2번이 53.3%로 가장 많았으며 3번 이상이 41.3%였다. 대조군은 3번 이상이 53.3%로 가장 많았다. 칫솔질 방법을 살펴보면 실험군에서 위, 아래로 닦는다가 64.1%로 가장 많았으며 대조군에서는 위·아래로 닦는다가 93.4%로 가장 많았다. 칫솔질 부위를 살펴보면 실험군과 대조군 모두에서 치아와 잇몸 그리고 혀까지 닦는다고 한

경우가 각각 45.7%, 63.3%로 가장 많았다 (Table 5).

### 3.5 대상자의 치면 세마 경험

실험군과 대조군의 치면세마 경험을 분석한 결과 실험군에서 경험이 없다고 한 경우가 40.3%였으며 6개월 이상이라고 한 경우가 36.9%였다. 대조군에서는 6개월 이상이라고 한 경우가 33.3%로 가장 많았으며 경험이 없다고 한 경우도 30.0%였다 (Table 6).

Table 5. Comparison between normal and periodontitis patients on toothmanagement

unit: %

| Variables                | Normal   | Periodontitis |
|--------------------------|----------|---------------|
| No. of tooth brushing    |          |               |
| 1 time                   | 1(3.4)   | 5(5.4)        |
| 2 times                  | 13(43.3) | 49(53.3)      |
| over 3 times             | 16(53.3) | 38(41.3)      |
| Toothbrushing method     |          |               |
| Up and down              | 28(93.4) | 59(64.1)      |
| Side by side             | 1(3.3)   | 25(27.2)      |
| Rolling                  | 1(3.3)   | 5(5.4)        |
| Random                   | -        | 3(3.3)        |
| Toothbrushing bounds     |          |               |
| Teeth                    | 3(10.0)  | 15(16.3)      |
| Teeth + gingiva          | 8(26.7)  | 35(38.0)      |
| Teeth + gingiva + tongue | 19(63.3) | 42(45.7)      |
| Total                    | 30(100)  | 92(100)       |

Table 6. Oral prophylaxis experience for normal and periodontitis patients.

unit: %

| Duration       | Normal   | Periodontitis |
|----------------|----------|---------------|
| within 1 month | 5(16.7)  | 5(5.4)        |
| 1~3 month      | 2(6.6)   | 11(12.0)      |
| 3~6 month      | 4(13.4)  | 5(5.4)        |
| over 6 months  | 10(33.3) | 34(36.9)      |
| no experience  | 9(30.0)  | 37(40.3)      |
| Total          | 30(100)  | 92(100)       |

Table 7. Precaution treatment of periodontal disease for normal and periodontitis patients.

unit: %

| Variables                   | Normal     | Periodontitis |
|-----------------------------|------------|---------------|
| Toothbrushing               | 81(87.1)   | 22(81.5)      |
| Formal scaling              | 14(15.1)   | 6(22.2)       |
| Taking medicine by oral     | -          | -             |
| Use of oral hygiene product | 5( 5.4)    | 2( 7.4)       |
| Total                       | 100(107.5) | 30(111.1)     |

### 3.6 대상자의 치주 질환 예방법의 이용

실험군과 대조군의 치주질환 예방법으로 실험군과 대조군 모두 칫솔질이라고 한 경우가 각각 81.5%, 87.1%로 가장 많았으며 정기적인

스케일링이라고 한 경우가 실험군에서 22.2%, 대조군에서는 15.1%였다. 구강위생용품을 사용한다고 한 경우가 실험군에서는 7.4%, 대조군에서 5.4%였다(Table 7).

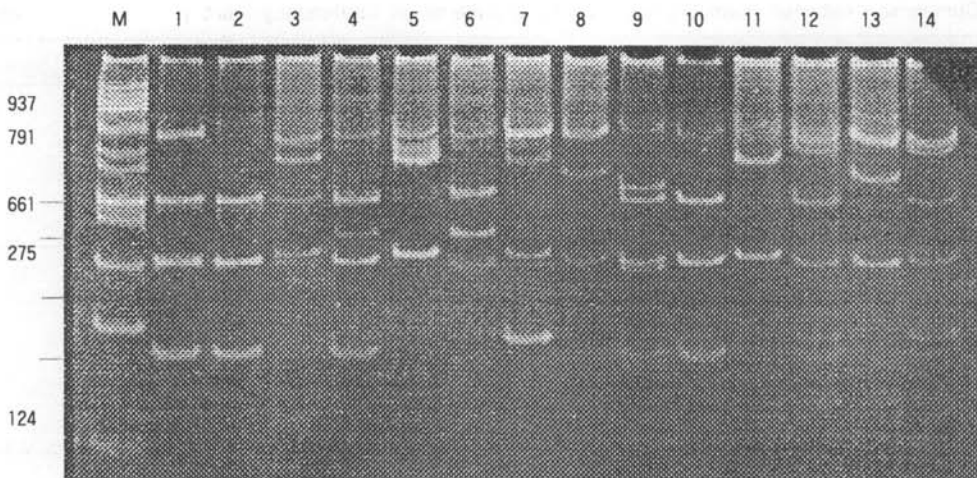


Fig 1. Typical patterns of analysis by PCR/*Hinf* I restriction enzyme digestion at the 16s rRNA gene. PCR products were subjected to 10% PAGE for separation and then EtBr staining for visualization(lanes 1 thru 14 were a product of electrophoresis)

\* *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are represented 937(bps) fragments; *Hemophilus aphrophilus*, 661 and 275; and *H. paraphrophilus*, 791 and 124.

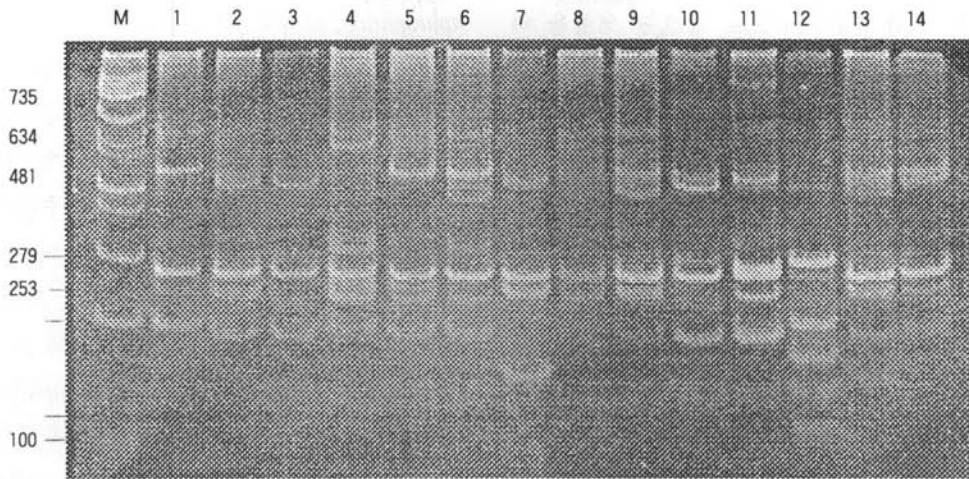


Fig 2. Typical patterns of analysis by PCR/*Hha* I restriction enzyme digestion at the 16s rRNA gene. PCR products were subjected to 10% PAGE for separation and then EtBr staining for visualization (lanes 1 thru 14 were a product of electrophoresis)

\* *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are represented 735 and 279(bps) fragments; *Hemophilus aphrophilus*, 634, 279 and 100; and *H. paraphrophilus*, 481, 279 and 253.

## 4. 고 인

치주질환 환자의 치은연하치태에 존재하는 다양한 종류의 세균 가운데 소수의 세균만이 건강한 상태에서 치주질환 상태로 전이하는 데 관련이 있다. 이들 균 중 그람음성 혐기성 세균의 비율이 증가할 때 치주질환의 발생 정도가 증가한다고 알려져 있다<sup>9)</sup>. 치주질환을 일으키는 세균의 종류는 *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *H. paraphrophilus*, *H. aphrophilus* 등을 들 수 있으며, 이들 균과 치주질환의 연관성에 대한 많은 연구가 계속되어 왔다<sup>10-24)</sup>.

성인형 치주염은 30세 이상의 연령에서 나타나는 가장 빈발한 형태의 치주염으로 치은염이 진행되어 나타난다고 볼 수 있고, 병원성 치은연하 세균에 의해서 발생된다. 이 경우 전신질환을 동반하는 예는 없고, 주로 만성으로 장기간의 휴지기를 거쳐 짧은 기간 내에 활동성으

로 나타나며 조직을 파괴하게 된다. 청소년기의 치은연하치태내의 치주질환과 관련된 세균에 대한 연구에 따르면, 특히 *P. intermedia*의 비율이 사춘기에 일시적으로 증가한다<sup>25)</sup>. Savitt와 Kent<sup>26)</sup>는 10대에서 *A. actinomycetemcomitans*가 가장 빈번하고 이후 점차 감소하며, *P. gingivalis*는 10대에서 비율이 가장 적으며, 40대까지 점차 증가하다가 이후에 감소한다고 보고하였다.

치태내의 세균 구성에 관한 연구 결과들에 있어서 Singletary 등<sup>27)</sup>은 건강한 부위에서 구균이 62.3%로서 가장 많은 비율을 차지하며, 병적인 상태인 경우에는 운동성균(운동성 간균 + 나선균)의 비율이 43.7%를 차지한다고 하였으며, 운동성 세균의 존재는 치주질환의 활성도를 추정하는 지표로서 이용될 수 있다고 하였다. 또한 운동성 세균이 전체의 1/5 이상, 구균이 1/3 이하의 비율로 존재하는 경우 병적인 상태라고 주장하였다.

Tanner 등<sup>28)</sup>은 *P. micros*가 치주조직 파괴에

기여하는 그람양성 세균으로 중요한 역할을 하며 *P. gingivalis*은 심한 치주질환 부위에서 세균의 높은 분포를 보일 뿐 아니라 전반적인 유년형 치주염에서 또한 높은 분포를 나타내며, 병적 잠재력이 높아서 치주에 염증을 심화시킨다고 하였다. 진행성 치주염에서 *P. gingivalis*, *P. intermedia*는 급속 진행성 치주염의 원인균으로 작용하며 Vincent 등<sup>29)</sup>의 연구에서는 성인형 치주염에서 *P. gingivalis*의 항체 지수가 증가했으며, 유년성 치주염이나 급속 진행성 치주염에서 *A. actinomycetemcomitans*의 항체 지수가 증가한다고 하였다. 치주조직의 파괴는 여러 연구에서 치주염 환자의 질환 활성이 증가된 시기에 특정 치주 원인균에 대해 항체가 증가되어 있는 것이 보고되었다.

최근에 가장 널리 사용되어지는 실험방법으로 PCR을 이용한 16S rRNA 유전자의 증합효소 연쇄반응은 치은연하치태 및 타액의 세균을 검출하는 데 민감하고 특이성이 있는 방법이다. 수많은 증폭 부위 중에서 16S rRNA 유전자가 PCR을 위한 가장 적절한 부위로 평가되고 있는데 그 이유는 16S rRNA는 모든 세균에 존재하여 동일한 염기 서열을 나타내는 보존 부위와 종마다 특이한 부위로 구성되어 있기 때문이다<sup>30-32)</sup>.

Scotland의 Glasgow 치과대학병원에서 치주염 환자를 대상으로 총 45명에게서 subgingival plaque sample을 채취하여 실험한 결과 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* 검출 빈도가 각각 44.5%(20명), 44.5%(20명), 11%(5명)로 *A. actinomycetemcomitans*와 *H. aphrophilus* 균이 가장 우세하게 나타났고 *H. paraphrophilus*가 가장 낮게 나타났으며<sup>12)</sup>, 본 실험에서의 경우 치주염 환자를 대상으로 subgingival plaque sample을 채취하여 실험한 결과 *A. actinomycetemcomitans*, *H.*

*aphrophilus*, *H. paraphrophilus* 검출 빈도가 각각 53.5%, 0%, 43%로 나타나 *A. actinomycetemcomitans*가 다른 세균에 비하여 가장 우세하게 나타났고, *H. aphrophilus*가 가장 낮게 나타났었다. 연세대학교 치과대학 부속병원 치주과의 경우에서도 *A. actinomycetemcomitans*가 다른 세균들에 비하여 가장 우세하게 나타나 치주질환을 일으키는 데 가장 큰 병인이 되었으며<sup>33)</sup>, Scotland의 경우에는 *H. paraphrophilus*가 가장 낮게 나타났으나<sup>12)</sup>, 한국의 경우에는 *H. aphrophilus*가 가장 낮게 나타나 *H. aphrophilus*는 치주질환을 일으키는 병인에서 큰 역할을 하지 못할 것으로 간주된다.

또한, 설문조사 내용에 따른 구강관리 형태를 살펴보면, 칫솔질 횟수에서 대상자 모두 2회 이상 칫솔질을 하고 있는 것으로 나타나 치주학적으로 건강하거나 치주질환을 앓고 있는 환자의 구강보건관리가 이루어지고 있음을 알 수 있었으나 올바른 방법으로 칫솔질을 행하고 있지 않은 것으로 보아 구강건강 행동변화의 동기유발을 시키기 위해 우선적으로 구강보건교육이 절실히 필요한 것으로 사료된다.

칫솔질 부위를 살펴보면, 치주염 환자의 경우 치아와 잇몸 그리고 혀까지 닦는다가 45.7%로 가장 많이 나타났으며, 치주학적으로 건강한 피실험자의 경우 63.3%로 나타나 건강한 피실험자가 치주염 환자보다 효과적인 칫솔질을 실천하고 있는 것으로 생각되어진다.

치마세마 경험을 살펴보면, 전혀 경험이 없다고 응답한 경우가 치주염 환자의 경우 40.3%, 건강한 피실험자의 경우 30.0%로 나타나 정기적인 scaling이 필요한 것으로 나타났으며, 치주질환 예방법의 가장 기본이 되는 칫솔질을 올바른 방법으로 실천하는 것이 중요하다고 사료된다.

## 5. 결 론

치주질환과 밀접하게 관련된 치주학적 병원균인 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*의 세균의 분포도를 비교하기 위하여 16s rRNA 분석법을 사용하여 치주염 환자 92명과 치주학적으로 건강한 피실험자 30명의 치은연하치태 및 타액을 채취하여 PCR을 실시하여 구강내 세균의 분포를 분석하여 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Saliva sample에서 치주학적으로 건강한 대조군의 경우 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*가 각각 42.1%, 2.6%, 23.7%로 나타났으며 그 중 *A. actinomycetemcomitans*의 분포가 가장 높았고, 치주염 환자인 실험군의 경우에는 *H. paraphrophilus*가 가장 많았다.

성별에 따른 세균의 분포를 살펴보면 남자 치주염 환자의 saliva sample에서 *H. paraphrophilus*의 분포가 가장 높았으며, 여자 치주염 환자의 경우 *A. actinomycetemcomitans*가 가장 많았다.

2. Subgingival plaque sample에서의 치주학적으로 건강한 대조군의 경우 세균의 분포는 *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus* 및 *H. paraphrophilus*가 각각 44%, 2.0%, 48%로 나타나 *H. paraphrophilus*가 가장 많았으며, 실험군에서는 *A. actinomycetemcomitans*가 가장 많았다. 성별에 따른 세균의 분포는 남녀 모두 *A. actinomycetemcomitans*가 가장 많았다.
3. 칫솔질 횟수, 방법, 부위에서는 치주염 환자보다 치주학적으로 건강한 피실험자가 올바른 칫솔질을 실천하고 있었으며, 치면세마경험에서는 대상자 대부분이 치면세마

의 경험이 없거나 6개월 이상 된 것으로 나타났다.

이상의 결과를 볼 때 치주질환 병원균은 타액에서보다 치은연하치태에서 더 빈번히 분포되어 있으며, 각 병원균에 대한 PCR 결과 *A. actinomycetemcomitans*와 *H. paraphrophilus*가 치주학적으로 건강한 사람 및 치주질환 환자에서 공통적으로 검출되어 치주질환의 주범임이 확인되었으므로 치주질환을 예방하기 위해서 정기적인 구강검진 및 치면세마처치가 필요하며 올바른 칫솔질법의 교육 등으로 치주조직의 건강관리 실천률을 높여야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Simon DT, Joel DR. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16s rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbio 1996; 2674-2678.
2. Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers DW. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. J periodontal 1982; 53(9): 550-556.
3. Evian CI, Rosenbery ES, Listgarten MA. Bacterial variability within diseased periodontal sites. J periodontol 1982; 53(10): 595-598.
4. Listgarten MA, Levin S. Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria

- and susceptibility of human subject to periodontal deterioration. J Clin Perio 1981; 8(2): 122-138.
5. Miyazaki H, Sakuo S, Katoh Y, Takehara T. Correlation between volatile sulfur compounds and certain oral health measurement in the general population. J periodontol 1995; 66(8): 679-684.
  6. Darveau RP, Tanner ACR, Page RC. The microbial challenge in Periodontitis. Periodontol 2000 1997; 14: 12-32.
  7. Socransky SS. Microbiology of periodontal disease, present status and future considerations. J Periodontol 1977; 48(9): 497-504.
  8. Simon DT, Joel DR. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16s rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbiol 1999; 3504-3508.
  9. Asikainen S, Dogan B, Jousimies-Somer H. Evaluation of two commercial kits and arbitrarily primed PCR for identification and differentiation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Hemophilus aphrophilus* and *Hemophilus paraphrophilus*. J Clin Microbiol 1999; 37(3): 742-747.
  10. Bergenholtz A, Hanstrom L. The Plaque inhibiting effect of hexetidine mouthwash compared to that of chlorohexidine. Community Dent Oral Epidemiol 1974; 2(2): 70-74.
  11. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease-current concepts. J Periodontol 1992; 63(4): 322-331.
  12. He T, Hayashi J, Yamamoto M, Ishikawa I. Genotypic characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from periodontitis patients by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J Periodontol 1998; 69(1): 69-75.
  13. Marcello PR, Alan L. Rapid Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Hemophilus aphrophilus* and *Hemophilus paraphrophilus* by restriction enzyme analysis of PCR-amplified 16s rRNA genes. J Clin Microbiol 1997; 1630-1632.
  14. Thomas FF, Stefan R, Ulrich H et al. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. J Clin Microbiol 1995; 3102-3105.
  15. Siegrist BE, Gusberti FA, Brex MC, Weber HP, Long NP. Efficacy for Supervised rinsing with chlorohexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. J Periodon Res 1980: 60-73.
  16. 문혁수, 박덕영, 마득상 외 6인. Triclosan을 배합한 세치제의 치은염 완화 효과와 치면세 균막형성 억제효과 및 구강질환 원인균에 대한 항균 효과에 관한 연구. 대한구강보건학회지 1998; 22(2): 171-172.
  17. 윤정원, 김성주, 백태일.  $\alpha$ -1,3 glucose를 배합한 세치제 및 양치액의 인조치면세균막 제거 효과에 관한 연구. 대한구강보건

- 학회지 1994; 18(1): 228-238.
18. American Dental Association. Council on Dental Therapeutics. Guidelines for acceptance of chemotherapeutic product for the control of supragingival dental plaque and gingival. Am Dent Assoc 1986; 112: 529-532.
  19. Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol 1979; 6(5): 278-307.
  20. Dzink JL, Tanner ACR, Socransky SS, Haffajee AD. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol 1985; 12(8): 648-659.
  21. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Frey DE. Human immune responses to oral microorganism: Patterns of systematic antibody levels to bacteroides species. Infect Immun 1986; 51(2): 507-513.
  22. Wolff LF, Liljemark WF, Philstrom BL, Schaffer EM, Aeppli DM, Bandt CL. Dark-pigmented Bacteroides Species in subgingival plaque of adult patients on a rigorous recall programs. J Periodontol Res 1988; 23(3): 170-174.
  23. Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, Simbert RM, Burneister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. J Clin Periodontol 1991; 18(10): 729-739.
  24. Zambon JJ, Haraszthy VI, Hariharan G, Lally ET, Demuth DR. The microbiology of early-onset periodontitis: Association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. J Periodontol 1996; 67: 282-290.
  25. Wojcicki CJ, Harper DS, Robinson PJ. Differences in periodontal disease-associated microorganisms of subgingival plaque in prepubertal, pubertal and postpubertal children. J Periodontol 1987; 58(4): 219-223.
  26. Savitt ED, Kent RL. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* by subject age. J Periodontol 1991; 62(8): 490-494.
  27. Singletary MM, Crawford JJ, Simpson DM. Dark-field microscopic monitoring of subgingival bacteria during periodontal therapy. J Periodontol 1982; 53(11): 671-681.
  28. Tanner AC, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. J Periodontol Res 1984; 19(3): 279-291.
  29. Vincent JW, Falkler WA Jr, Cornett WC, Suzuki JB. Effect of periodontal therapy on specific antibody responses to suspected periodontopathogens. J Clin Periodontol 1987; 14(7): 412-417.
  30. Schmidt TM, Relman DA. Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences. Methods Enzymol 1994; 235: 205-222.
  31. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative perio-

- dontal pathogens in subgingival specimens by 16s ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1995; 20(2): 304-307.
32. Riggio MP, Lennon A, Roy KM. Detection of *Prevotella intermedia* in subgingival plaque of adult periodontitis patients by polymerase chain reaction. J Periodontol Res 1998; 33(6): 369-376.
33. 이정옥. 한국인 급속 진행형 치주염 환자에서 16s ribosomal RNA 분석을 이용한 치주 병원균분포. 연세대학교 대학원 석사 학위 논문. 2000.

## Abstract

# The Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Hemophilus aphrophilus* and *Hemophilus paraphrophilus* in Subgingival Plaque and Saliva from Korean Periodontitis Patients using PCR

Ok-Sun Choi<sup>1</sup>, Gwang-Sook Ahn<sup>1</sup>, Hye-Jin Kim, Eun-Sook Lee

<sup>1</sup>Dept. of Biology, Daejeon University,  
Dept. of Dental Hygiene, Gimcheon College

Key words: PCR, Periodontitis, *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus*, *H. araphrophilus*

The closely related species *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Hemophilus aphrophilus* and *Hemophilus paraphrophilus* are common findings in oral microbiota. The aims of this study were to compare the distribution of three species in healthy subjects and periodontitis patients using PCR for 16s rRNA gene. The DNA was extracted from the subgingival plaque and saliva in 122 subjects for restriction enzyme analysis with *Hinf* I and *Hha* I.

In case of periodontally healthy person, *A. actinomycetemcomitans* was predominant than *H. paraphrophilus* in saliva sample, but *H. paraphrophilus* was predominant than *A. actinomycetemcomitans* in subgingival plaque sample.

On the contrary, in case of periodontitis patients, *H. paraphrophilus* was predominant than *A. actinomycetemcomitans* in saliva sample, but *A. actinomycetemcomitans* was predominant than *H. paraphrophilus* in subgingival plaque sample.

In addition, the fact was confirmed that the distribution of *A. actinomycetemcomitans* of women periodontitis patients was somewhat higher than men periodontitis patients in saliva and subgingival plaque samples.

We convinced that the PCR method for 16s rRNA gene was important for screening and monitoring of periodontal disease.